

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3P

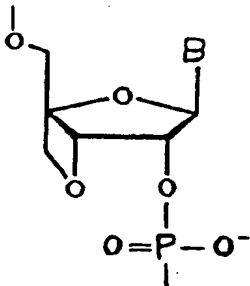
世界知的所有権機関  
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



CB

(51) 国際特許分類6 C07H 21/00, 19/06, 19/16, A61K 31/70	A1	(11) 国際公開番号 WO98/22489  (43) 国際公開日 1998年5月28日(28.05.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04187 (22) 国際出願日 1997年11月18日(18.11.97) (30) 優先権データ 特願平8/306585 1996年11月18日(18.11.96) JP (71) 出願人 ; および (72) 発明者 今西 武(IMANISHI, Takeshi)[JP/JP] 〒631 奈良県奈良市千代ヶ丘2丁目2-18 Nara, (JP) (74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 浅法律特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: NOVEL NUCLEOTIDE ANALOGUES (54) 発明の名称 新規ヌクレオチド類縁体 (57) Abstract Oligonucleotide analogues, an antisense molecule, which are difficultly hydrolyzable by an enzyme in vivo, exhibit a high binding power for sense strand, and are easy of synthesis. Constitution: oligo- or polynucleotide analogues containing one or more nucleotide analogue monomer units represented by general formula (I) wherein B's are each independently a pyrimidine or purine nucleic acid base or a derivative thereof. <div style="text-align: center;">  <p>(I)</p> </div>		

BEST AVAILABLE COPY

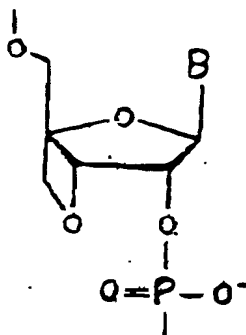
1996. 11. 18

( X-1959PCT YCI-306 )

**CONFIDENTIAL**

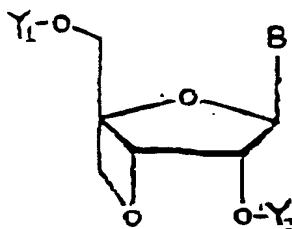
What is claimed is:

1. An oligo- or polynucleotide analogue containing at least one monomeric unit represented by the formula:



wherein B may be the same or different and represents a pyrimidine or a purine base.

2. A nucleoside analogue represented by the formula:



wherein B is a pyrimidine or purine base or its analogue and Y<sub>1</sub> and Y<sub>2</sub> may be the same or different and represents hydrogen or a protection group for hydroxy group.

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

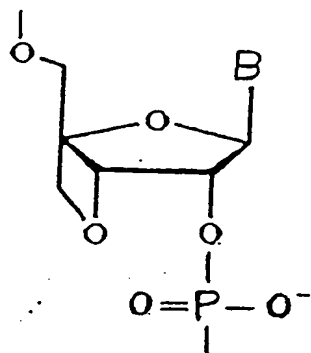


(51) 国際特許分類6 C07H 21/00, 19/06, 19/16, A61K 31/70	A1	(11) 国際公開番号 WO98/22489 (43) 国際公開日 1998年5月28日(28.05.98)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04187</p> <p>(22) 国際出願日 1997年11月18日(18.11.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/306585 1996年11月18日(18.11.96) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 今西 武(IMANISHI, Takeshi)[JP/JP] 〒631 奈良県奈良市千代ヶ丘2丁目2-18 Nara, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 浅法律特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL NUCLEOTIDE ANALOGUES</p> <p>(54)発明の名称 新規ヌクレオチド類縁体</p> <p>(57) Abstract Oligonucleotide analogues, an antisense molecule, which are difficultly hydrolyzable by an enzyme in vivo, exhibit a high binding power for sense strand, and are easy of synthesis. Constitution: oligo- or polynucleotide analogues containing one or more nucleotide analogue monomer units represented by general formula (I) wherein B's are each independently a pyrimidine or purine nucleic acid base or a derivative thereof.</p> <div data-bbox="841 1260 1299 1554"><p>(I)</p></div>		

(57) 要約

生体内で酵素の加水分解を受けにくく、センス鎖との結合能が高く、しかも合成が容易であるオリゴヌクレオチド類縁体・アンチセンス分子を提供する。

構成 一般式：



[式中、Bは同一または異なってもよく、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基またはそれらの誘導体である] で表されるヌクレオチド類縁体であるモノマー単位を1または2以上含有するオリゴまたはポリヌクレオチド類縁体。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FR	フランス	LT	リトアニア	NZ	ニュージーランド
AM	アルメニア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	GE	ジョージア	MC	モナコ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SI	スロベニア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	HN	ホンデュラス	MG	マダガスカル	SK	スロバキア
BB	バハマ	IE	アイルランド	MK	マケドニア	SL	シエラレオネ
BE	ベルギー	IT	イタリア	ML	マリ		
BG	ブルガリア	JP	日本	MR	モーリタニア		
BJ	ベナン	KE	ケニア	MW	マラウイ		
BR	ブラジル	KR	韓国	MX	メキシコ		
BS	バハマ	RU	ロシア	NE	ニジェール		
BT	ブータン	SE	スウェーデン	NO	ノルウェー		
BV	ブービヤ	SI	スロベニア	NZ	ニュージーランド		
CA	カナダ	TH	タイ	PE	ペルー		
CC	ココス (キリング) 島	TR	トルコ	PG	パプアニューギニア		
CD	コンゴ民主共和国	UA	ウクライナ	PR	プエルトリコ		
CF	中央アフリカ共和国	US	アメリカ合衆国	PT	ポルトガル		
CG	コンゴ共和国	VE	ベネズエラ	RO	ルーマニア		
CH	スイス	GB	イギリス	RS	セルビア		
CI	コートジボワール	DE	ドイツ	SS	南スルバニア		
CK	クック	DK	デンマーク	SK	スロバキア		
CM	カメルーン	EE	エストニア	SL	シエラレオネ		
CN	中国						
CO	コロンビア						
CR	コスタリカ						
CU	キューバ						
CY	キプロス						
CZ	チェコ						
DE	ドイツ						
EE	エストニア						

## 明細書

## 新規ヌクレオチド類縁体

## 〔技術分野〕

本発明は新規なヌクレオチド類縁体に関し、更に詳細にはアンチセンス分子に適したヌクレオチド類縁体に関するものである。

## 〔背景技術〕

1978年アンチセンス分子がインフルエンザウィルスの感染を阻害したとの報告が初めてなされた。以後、ガン遺伝子発現やAIDS感染を阻害したとの報告もなされている。アンチセンスオリゴヌクレオチドが望ましくない遺伝子の発現を特異的に制御することから、医薬品として近年、最も期待されている分野のうちの一つである。

アンチセンス法とは、DNA→RNA→タンパク質という、いわゆるセントラルドグマの一連の流れをアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて制御しようという概念に基づいている。

しかしながら、天然型オリゴヌクレオチドをアンチセンス分子としてこの方法に適用した場合、生体内の酵素により加水分解を受けたり、細胞膜透過性が高くないなどの問題が生じた。そしてこれらを解消するために核酸誘導体が数多く合成され、研究が重ねられてきた。例えば、リン原子上の酸素原子をイオウ原子に置換したホスホロチオエート、メチル基に置換したメチルホスホネート、また最近になっては、リン原子も炭素原子で置換したものやリボースを非環式骨格にした分子も合成されている (F. Eckstein et al., Biochem., 18, 592(1979), P. S. Miller et al., Nucleic Acids Res., 11, 5189 (1983), P. Herdewijn et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1567 (1993), P. E. Nielsen et al., Science, 254, 1497 (1991))。

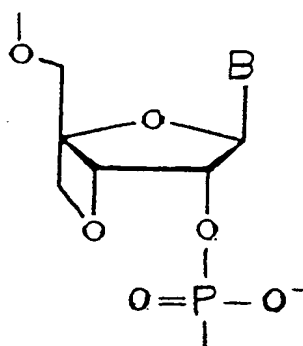
しかし、いずれの場合も、生体内での安定性またはオリゴヌクレオチドの合成の容易さ等の点で満足のいく誘導体が得られていない。

生体内で細胞膜透過性が高く、酵素の加水分解を受けにくく、しかも合成が容易であるアンチセンス分子用のヌクレオチド類縁体が提供されることが望まれている。

[発明の開示]

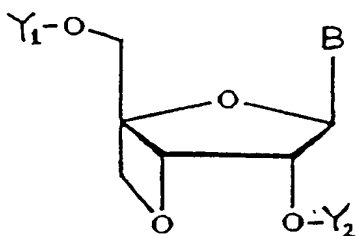
- 5 本発明の発明者等は、アンチセンス法において有用であろう、核酸の糖部分を修飾した核酸誘導体を設計し、それを合成してその有用性を確認した。以下に本発明を説明する。

本発明のヌクレオチド類縁体は下記の一般式：



- 10 [式中、Bは同一または異なってもよく、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基またはそれらの誘導体である] で表されるヌクレオチド類縁体であるモノマー単位を1または2以上含有するオリゴまたはポリヌクレオチド類縁体である。

このモノマー単位は一般式：



[式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、



Y<sub>1</sub>及びY<sub>2</sub>は同一もしくは異なり、水素または水酸基の保護基である。保護基としては公知のどのような基も使用できるが、好ましくは、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、アシル基、アラルキル基又はシリル基である]で表わされるヌクレオシド類縁体もしくはそれらのアミダイト誘導体である。

アルキル基とは炭素数1-20の直鎖または分枝鎖状のアルキル基を示し、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、t-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基等があげられる。

アルケニル基とは、炭素数2-20の直鎖または分枝鎖状のアルケニル基を示し、例えば、ビニル基、アリル基、ブテニル基、ペンテニル基、ゲラニル基、ファルネシル基等があげられる。

アルキニル基とは、炭素数2-20の直鎖または分枝鎖状のアルキニル基を示し、例えば、エチニル基、プロピニル基、ブチニル基等があげられる。

シクロアルキル基とは、炭素数3-8のシクロアルキル基を示し、例えば、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基等があげられる。シクロアルキル基の環上の1つ以上の任意のメチレンが酸素原子や硫黄原子あるいはアルキル基で置換された窒素原子に置換された複素環基も含まれ、例えばテトラヒドロピラニル基などがあげられる。

アリール基とは、芳香族炭化水素基から水素原子1個を除いた1価の置換基を意味し、例えば、フェニル基、トリル基、キシリル基、ビフェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基等である。また、アリール基の環上の炭素原子はハロゲン原子、低級アルキル基、水酸基、アルコキシ基、アミノ基、ニトロ基、トリフルオロメチル基等の1種以上の基によって置換されていてもよい。置換基としてはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、アルコキシ基、アリールオキシ基等があげられる。

アシル基としては、アセチル基、ホルミル基、プロピオニル基、ベンゾイル基、

ベンジルオキシカルボニル基等があげられる。シリル基の例としては、トリアルキルシリル基があげられるが、好ましくは、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリイソプロピルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、*t*-ブチルジフェニルシリル基等があげられ、更に好ましくはトリメチルシリル基である。

- 5     アラルキル基とは、芳香族炭化水素で置換されたアルキル基を意味し、好ましくはベンジル基、トリチル基である。各々の芳香環は置換されていてもよい。更に好ましいアラルキル基としては、4, 4'-ジメトキシトリチル (DMTr) 基である。

- 10     本発明における、ピリミジン又はプリン核酸塩基とは、チミン、ウラシル、シトシン、アデニン、グアニン及びそれらの誘導体である。

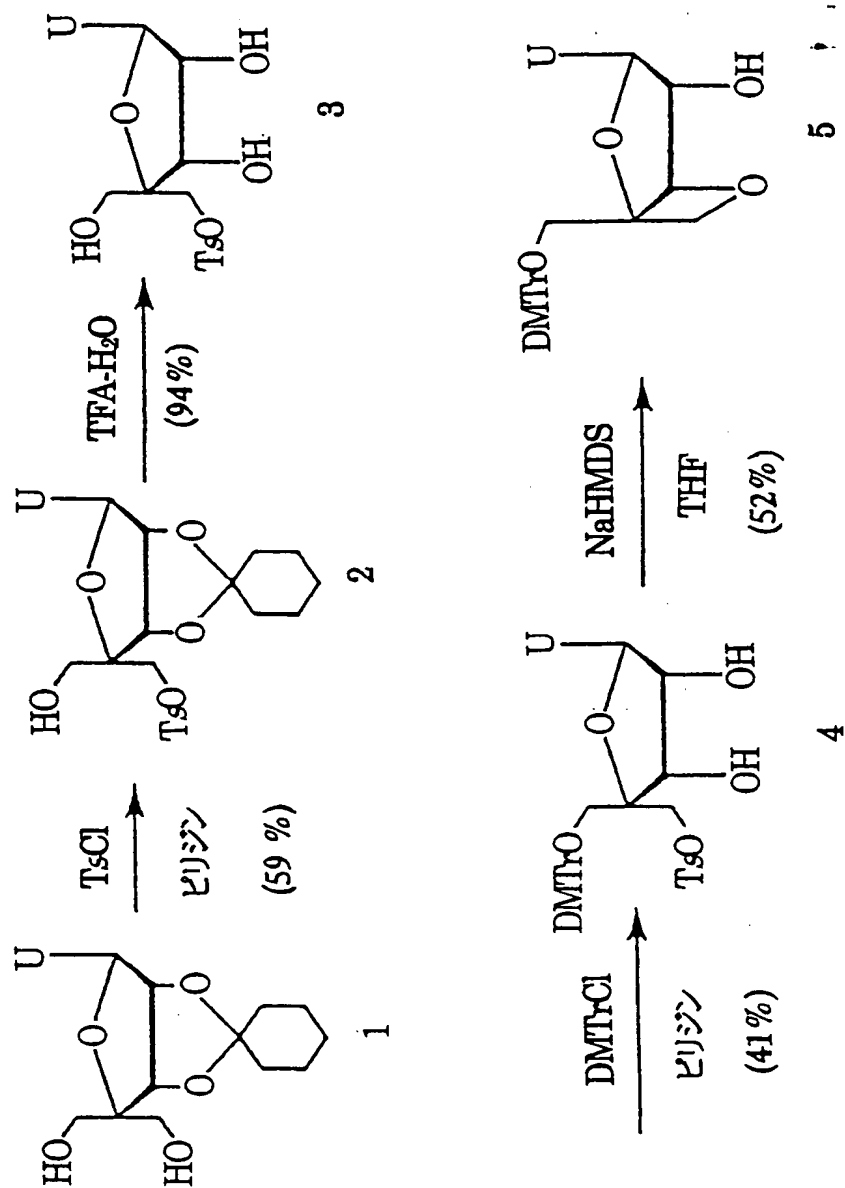
[図面の簡単な説明]

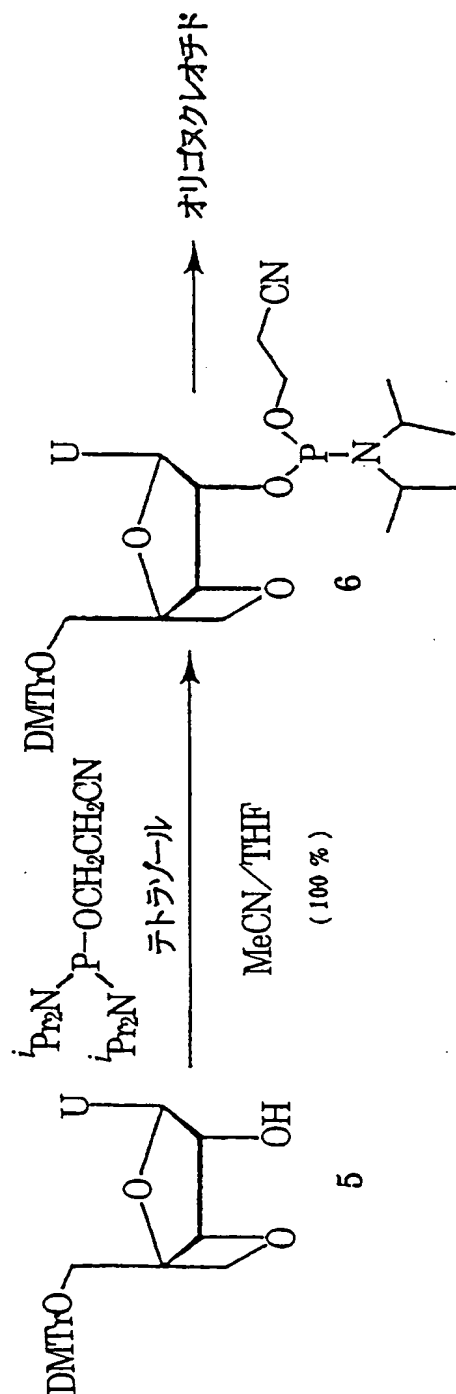
図1 天然型のオリゴヌクレオチドをエキソヌクレアーゼで分解した時の紫外部吸収 (260 nm) の経時変化を示すチャートである。

- 15     図2 本発明のオリゴヌクレオチド (X2) をエキソヌクレアーゼで分解した時の紫外部吸収 (260 nm) の経時的変化を示すチャートである]。

本発明のヌクレオチド類縁体は次のように合成できる。説明を簡明にするため、まず、上記の式中Bがウラシルである化合物を例にとって説明する。

(1) モノマーユニットの合成





文献既知の化合物である2', 3'-O-シクロヘキシリデン-ウリジン(1)をp-トルエンスルホニルクロリドと反応させて、化合物2を得る。次いで、この化合物をTFA-H<sub>2</sub>O中で撹拌することにより、4'-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)ウリジンである化合物3を得る。

- 5 化合物3に4, 4'-ジメトキシトリチルクロリドを反応させて、5'-位の水酸基を保護した化合物4を得る。さらに、NaHMDSと反応させることにより、5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-3'-O, 4'-メタノウリジン、化合物5を得る。

#### (2) オリゴヌクレオチド類縁体の合成

- 10 化合物5に2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトを作用させ、アミダイト体(化合物6)を得、DNAシンセサイザーを用いて種々のアンチセンスオリゴマー類縁体を合成する。次いで、得られるアンチセンスオリゴマー類縁体を逆相カラムを用いて精製し、精製物の純度を逆相HPLCで分析することにより、精製オリゴヌクレオチド類縁体の生成を確認できる。

- 15 化合物5のモノマーユニットは、オリゴヌクレオチド類縁体の中に1つ以上存在させることができる。また、オリゴヌクレオチド類縁体中の2カ所以上の位置に、1又は2以上の天然ヌクレオチドを介して隔離された状態で存在させても良い。本発明によれば、本発明のヌクレオチド類縁体を必要な位置に必要な数(長さ)で導入したアンチセンス分子を合成することができる。ヌクレオチド類縁体
- 20 全体の長さとしてヌクレオチド単位が2~50、好ましくは10~30個である。

- このようなアンチセンス分子は、エキソヌクレアーゼに対してばかりでなく、エンドヌクレアーゼに対しても分解されにくく、生体への投与後、長く生体内に存在することができる。そして、例えば、センス鎖RNAと二重鎖を形成して病
- 25 因となる生体内成分(タンパク質)の形成(翻訳)を阻害したり、二重鎖DNAとの間で三重鎖を形成してmRNAへの転写を阻害する。また、感染したウィルスの増殖を阻害すると考えられる。

これらのことから、本発明のヌクレオチド類縁体を用いたアンチセンス分子は、

抗腫瘍剤、抗ウィルス剤をはじめとした遺伝子の働きを阻害して疾病を治療する医薬品としての有用性が期待されている。

本発明のヌクレオチド類縁体を用いたアンチセンス分子は、例えば緩衝剤および／または安定剤等の慣用の助剤を配合して非経口投与用製剤とすることができる。また、局所用の製剤としては、慣用の医薬用担体を配合して軟膏、クリーム、液剤、または膏薬等に調剤できる。

本発明のヌクレオチド類縁体の合成を実施例及び製造例により、さらに詳しく説明する。

#### 実施例 1：モノマーユニットの合成

- 10 (1) 2', 3'-O-シクロヘキシリデン-4'-(p-トルエンスルホニルオキシメチル) ウリジン (化合物 2) の合成

- 窒素気流下、文献 (G. H. Jones et al, J. Org. Chem., 44, 1309(1979)) 既知の化合物 1 (956 mg, 2.70 mmol) の無水ピリジン (13.5 ml) 溶液に室温で p-トルエンスルホニルクロライド (771 mg, 4.05 mmol) を加え、60℃で5時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加えた後、ベンゼンで3回抽出した。有機層を飽和食塩水で1回洗浄後、無水MgSO<sub>4</sub>にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、ベンゼンで3回共沸し、得られた粗生成体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=15:1) により精製後、ベンゼン/ヘキサンにて再沈殿し、白色粉末 (化合物 2) (808 mg, 1.59 mmol, 59%) を得た。

mp104-106℃ (benzene/hexane).

IR(KBr):  $\nu_{max}$  3326, 2929, 2850, 1628, 1577, 1544, 1437, 1311, 1244 cm<sup>-1</sup>.

- <sup>1</sup>H-NMR(acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.45-1.67(10H, m, cyclohexyl-), 2.45(3H, s,  $\phi$ -CH<sub>3</sub>), 3.71(2H, ABq, J=11.5Hz, C5'-H<sub>2</sub>), 4.20(2H, ABq, J=10.5Hz, C4'-CH<sub>2</sub>OTs), 4.92(1H, d, J<sub>2'3'</sub>=6.4Hz, C3'-H), 5.05, 5.06(1H, dd, J<sub>1'2'</sub>=3.7Hz, J<sub>2'3'</sub>=6.4Hz, C2'-H), 5.60(1H, d, J<sub>4'5'</sub>=7.3Hz, C4-H), 5.75(1H, d, J<sub>1'2'</sub>=3.7Hz, C1'-H), 7.48(2H, d, J=8.2Hz,  $\phi$ ), 7.77(1H, d, J<sub>4'5'</sub>=7.8Hz, C5-H), 7.81(2H, d, J=8.2Hz,  $\phi$ ), 10.10(1H, s, NH).

<sup>13</sup>C-NMR(acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$  21.5, 24.1, 24.5, 25.5, 34.8, 36.9, 63.5, 69.7, 82.5, 84.7,

87. 8. 92. 9. 102. 9. 115. 4. 128. 8. 130. 8. 133. 9. 142. 7. 145. 9. 151. 3. 163. 5.

Mass(EI):  $m/z$  481( $M^+ - H_2O$ ).

Anal Calcd. for  $C_{23}H_{28}N_2O_9S \cdot 1/3 H_2O$ : C, 53.69; H, 5.61; N, 5.44; S, 6.22. Found: C, 53.99; H, 5.48; N, 5.42; S, 6.10.

5

(2) 4' - (p-トルエンスルホニルオキシメチル) ウリジン (化合物3) の合成

上記の化合物2 (107 mg, 0.21 mmol) を TFA-H<sub>2</sub>O (98 : 2, 1 ml) 中室温で10分間攪拌した。反応液を減圧留去し、エタノールを加えて3回共沸した。得られた粗生成体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 10 : 1) により精製し、白色粉末 (化合物3) (85.0 mg, 0.20 mmol, 94%) を得た。

mp 119-120°C.

IR(KBr):  $\nu_{max}$  3227, 3060, 2932, 2837, 1709, 1508, 1464, 1252, 978, 835, 763, 556 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR(acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$  2.31(3H, s,  $\phi$ -CH<sub>3</sub>), 2.84(3H, s, OH), 3.71(2H, s, C5'-H<sub>2</sub>), 4.13, 4.20(2H, ABq, J=10.9 Hz, C4'-CH<sub>2</sub>OTs), 4.28, 4.31(1H, dd, J<sub>1'2'</sub>=8.6 Hz, J<sub>2'3'</sub>=5.6 Hz, C2'-H), 4.36(1H, d, J<sub>2'3'</sub>=5.6 Hz, C3'-H), 5.54(1H, d, J<sub>4'5'</sub>=7.9 Hz, C4-H), 5.75(1H, d, J<sub>1'2'</sub>=6.6 Hz, C1'-H), 7.32(2H, d, J=7.9 Hz), 7.67(2H, d, J=8.2 Hz), 7.70(1H, d, J<sub>4'5'</sub>=8.3 Hz, C5-H), 10.14(1H, s, NH).

<sup>13</sup>C-NMR(acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$  21.5, 63.7, 70.8, 72.7, 74.6, 86.8, 88.8, 103.1, 128.8, 130.7, 133.9, 141.7, 145.8, 151.8, 163.9.

Mass(EI):  $m/z$  256( $M^+ - OTs$ ).

(3) 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル) - 4' - (p-トルエンスルホニルオキシメチル) ウリジン (化合物4) の合成

上記化合物3 (1.13 g, 2.64 mmol) に無水ピリジンを加えて3回共沸した後、無水ピリジン (14.5 ml) 溶液とし、窒素気流下、室温で4, 4'-ジメトキシトリチルクロライド (1.07 g, 3.17 mmol) を加え室

温で16時間攪拌した。

反応溶液に飽和重曹水を加えた後、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ で3回抽出した。有機層を飽和食塩水で1回洗浄後、無水 $\text{MgSO}_4$ にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、ベンゼンで2回共沸した後、得られた粗生成体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー

5 (  $\text{CHCl}_3 : \text{Et}_3\text{N} : \text{MeOH} = 60 : 2 : 0 \rightarrow 60 : 2 : 4$  ) により精製後、エタノール／ヘキサンにて再沈殿し、白色粉末 (化合物4) (868mg, 1.06mmol, 41%) を得た。

mp104-105°C (Et<sub>2</sub>O/hexane).

IR(KBr):  $\nu_{\text{max}}$  3396, 2937, 2737, 2675, 2493, 1691, 1474, 1397, 1173, 1035  $\text{cm}^{-1}$ .

10  $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6$ ):  $\delta$  2.41(3H, s,  $\phi$ - $\text{CH}_3$ ), 3.22, 3.33(2H, ABq,  $J=9.9\text{Hz}$ ,  $\text{C5}'\text{-H}_2$ ), 3.79(6H, s,  $p\text{-OCH}_3\text{-}\phi$ ), 4.29(1H, dd,  $J_{1'2'}=6.3\text{Hz}$ ,  $J_{2'3'}=5.6\text{Hz}$ ,  $\text{C2}'\text{-H}$ ), 4.34, 4.41(2H, ABq,  $J=11.2\text{Hz}$ ,  $\text{C4}'\text{-CH}_3\text{OTs}$ ), 4.40(1H, d,  $J_{2'3'}=5.6\text{Hz}$ ,  $\text{C3}'\text{-H}$ ), 5.35(1H, d,  $J_{4'5'}=8.3\text{Hz}$ ,  $\text{C4-H}$ ), 5.82(1H, d,  $J_{1'2'}=6.3\text{Hz}$ ,  $\text{C1}'\text{-H}$ ), 6.89(4H, d,  $J=8.9\text{Hz}$ ,  $p\text{-CH}_3\text{O-}\phi$ ), 7.26-7.41(7H, m), 7.43(1H, d,  $J_{4'5'}=8.3\text{Hz}$ ,  $\text{C5-H}$ ), 7.70(2H, d,  $J=8.3\text{Hz}$ ).

15  $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- $d_6$ ):  $\delta$  21.6, 55.5, 64.6, 70.7, 72.7, 74.3, 85.8, 87.8, 88.9, 102.8, 114.0, 127.7, 128.7, 128.8, 130.7, 130.9, 131.0, 133.9, 141.1, 145.5, 151.4, 159.7, 163.3.

Anal Calcd for  $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S} \cdot 1/3 \text{H}_2\text{O}$ : C, 61.95; H, 5.29; N, 3.80; S, 4.34. Found: C, 62.37; H, 5.26; N, 3.60; S, 4.15.

20

(4) 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3'-O,4'-メタノ  
ウリジン (化合物5) の合成

窒素気流下、化合物4 (735mg, 0.90mmol) の無水THF (11.1ml) 中に室温でNaHMDs (8.96mmol) の無水ベンゼン溶液 (4ml) を加え、室温で48時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加え、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ にて3回抽出した。有機層を飽和食塩水で1回洗浄した後、無水 $\text{MgSO}_4$ にて乾燥した。

溶媒を減圧留去し、得られた粗生成体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー



(CHCl<sub>3</sub>:Et<sub>3</sub>N:MeOH=60:2:0→60:2:4)により精製後、エタノール／ヘキサンにて再沈殿し、白色粉末(化合物5)(261mg, 0.47mmol, 52%)を得た。

mp120-121°C (Et<sub>2</sub>O/hexane).

5 IR(KBr):  $\nu_{max}$  3395, 3222, 3062, 2930, 1693, 1508, 1461, 1385, 1298, 1252, 1177, 1034 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR(acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$  2.92(1H, br s, OH), 3.47, 3.51(2H, ABq, J=10.3Hz, C5'-H<sub>2</sub>), 3.85(6H, s, p-OCH<sub>3</sub>- $\phi$ ), 4.36(1H, dd, J<sub>1'2'</sub>=4.3Hz, J<sub>2'3'</sub>=4.3Hz, C2'-H), 4.52, 4.83(2H, ABq, J=7.7Hz, C4'-CH<sub>2</sub>O-), 5.11(1H, d, J<sub>2'3'</sub>=4.3Hz, C3'-H), 5.57(1H, d, J<sub>4'5'</sub>=7.7Hz, C4-H), 6.51(1H, d, J<sub>1'2'</sub>=7.7Hz, C1'-H), 6.96(4H, d, J=8.6Hz, p-CH<sub>3</sub>O- $\phi$ ), 7.39-7.41(7H, m,  $\phi$ ), 7.52(2H, d, J=5.1Hz,  $\phi$ ), 7.71(1H, d, J<sub>4'5'</sub>=8.6Hz, C5-H).

<sup>13</sup>C-NMR(acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$  55.4, 64.1, 75.5, 79.0, 85.5, 86.2, 87.1, 88.8, 103.3, 113.7, 113.9, 127.6, 128.4, 128.6, 128.8, 129.9, 130.9, 131.1, 136.3, 136.4, 141.2, 145.7, 151.6, 159.6, 163.4.

15 Mass(EI): m/z 558(M<sup>+</sup>), 303(DmTr<sup>+</sup>), 256(M<sup>+</sup>-DmTr), 227(M<sup>+</sup>-DmTrOCH<sub>2</sub>).

(5) 2'-O-[2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ]-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3'-O,4'-メタノウリジン(化合物6)の合成

20 化合物5(261mg, 0.47mmol)、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド(39.9mg, 0.23mmol)を無水CH<sub>3</sub>CNで3回共沸した後、無水CH<sub>3</sub>CN-無水THF(5:1, 10ml)溶媒とし、窒素気流下、2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト(0.18ml, 0.56mmol)を加え、室温で30分撹拌した。

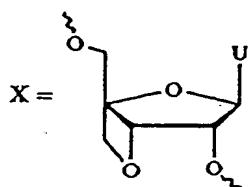
25 溶媒を減圧留去し、得られた粗生成体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(無水AcOEt:Et<sub>3</sub>N=100:4)により精製後、無水ジエチルエーテル／ヘキサンにて再沈殿し、白色粉末(化合物6)(340mg, 0.47mmol, 100%)を得た。

mp94-96°C (Et<sub>2</sub>O/hexane).

IR(KBr):  $\nu_{max}$  2966, 2252, 2049, 1697, 1607, 1509, 1460, 1298, 1253, 1038.

<sup>31</sup>P-NMR(acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$  150.8, 151.2.

## 5 実施例 2 : オリゴヌクレオチド類縁体の合成



|                              |          |
|------------------------------|----------|
| 5'-d(GCG-X-TTTTTGCT)-3'      | (XT5)    |
| 5'-d(GCGTT-X-TTTGCT)-3'      | (T2XT3)  |
| 5'-d(GCGTTT-X-TTGCT)-3'      | (T3XT2)  |
| 5'-d(GCGTTTTT-X-GCT)-3'      | (T5X)    |
| 5'-d(GCG-X-X-TTTTTGCT)-3'    | (X2T4)   |
| 5'-d(GCGTT-X-X-TTTGCT)-3'    | (T2X2T2) |
| 5'-d(GCGTTTT-X-X-GCT)-3'     | (T4X2)   |
| 5'-d(GCG-X-X-X-X-X-X-GCT)-3' | (X6)     |

### (1) 5' -GCGXTTTTTGCT-3' (XT5) の合成

3' -水酸基が支持体に結合した5' -O-ジメトキシトリチルチミジン (0.2  $\mu$ mol) のジメトキシトリチル基 (DMTr基) をトリクロロ酢酸によって脱保護し、その5' -水酸基に5' -O-ジメトキシトリチルデオキシシチジン 2-シアノエチルホスホアミダイト誘導体をテトラゾールにより縮合し、未反応の5' -水酸基を無水酢酸と4-ジメチルアミノピリジン、2, 4, 6-コリジンでアセチル化した後、ヨウ素と2, 4, 6-コリジン、水によりリンを酸化した。

同様に脱保護、縮合、アセチル化、酸化を繰り返した。(4員環アミダイト誘導体も他のアミダイト誘導体と同様に用いることができた。) 最後の5' -O-ジメトキシトリチルデオキシグアノシン2-シアノエチルホスホアミダイト誘導体を縮合し、酸化して得られた12-merのオリゴマー(ここまでの工程はPharmacia社製DNA合成装置Gene Assembler Plusにより行なった。)を濃アンモ

ニア水 1 ml によって支持体から切り出すとともに、リンからシアノエチル基をはずし、さらにアデニン、グアニン、シトシンの保護基をはずした。

得られた 5' -O-ジメトキシトリチルオリゴヌクレオチドは、逆相カラム (Millipore, Oligo-Pak™SP) 上でトリフルオロ酢酸 5 ml により DMTr 基をはずし、引き続き精製を行ない、目的の 5' -GCGXTTTTTGCT-3' (XT5) (0.02 mmol, 10%) を得た。得られたオリゴヌクレオチド類縁体の純度は逆相 HPLC により確認した。

(2) 5' -GCGTTXTTTGCT-3' (T2XT3) の合成

(1) と同様にして、目的の 5' -GCGTTXTTTGCT-3' (T2XT3) (0.04 mmol, 20%) を得た。

(3) 5' -GCGTTTXTTTGCT-3' (T3XT2) の合成

(1) と同様にして、目的の 5' -GCGTTTXTTTGCT-3' (T3XT2) (0.03 mmol, 15%) を得た。

(4) 5' -GCGTTTTTXGCT-3' (T5X) の合成

(1) と同様にして、目的の 5' -GCGTTTTTXGCT-3' (T5X) (0.02 mmol, 10%) を得た。

(5) 5' -GCGXXTTTTTGCT-3' (X2T4) の合成

(1) と同様にして、目的の 5' -GCGXXTTTTTGCT-3' (X2T4) (0.03 mmol, 15%) を得た。

(6) 5' -GCGTTXXTTTGCT-3' (T2X2T2) の合成

(1) と同様にして、目的の 5' -GCGTTXXTTTGCT-3' (T2X2T2) (0.03 mmol, 15%) を得た。

(7) 5' -GCGTTTTTXXGCT-3' (T4X2) の合成

(1) と同様にして、目的の 5' -GCGTTTTTXXGCT-3' (T4X2) (0.03 mmol, 15%) を得た。

(8) 5' -GCGXXXXXXGCT-3' (X6) の合成

(1) と同様にして、目的の 5' -GCGXXXXXXGCT-3' (X6) (0.03 mmol, 15%) を得た。

### 実験例 1 : 融解温度 ( $T_m$ ) の測定

実施例 2 で合成した種々のアンチセンス分子であるオリゴマー鎖 (アンチセンス鎖) とセンス鎖とをアニーリング処理したものの  $T_m$  を測定することにより、アンチセンスのハイブリッド形成能を調べた。

- 5 終濃度をそれぞれ、NaCl 100 mM、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 10 mM、アンチセンス鎖 4  $\mu$ M、センス鎖 4  $\mu$ M としたサンプル溶液 (500  $\mu$ L) を沸騰水中に浴し、10 時間かけて室温まで冷却した。分光光度計 (Shimadzu, UV-2100PC) のセル室内に結露防止のために窒素気流を通し、サンプル溶液を 5℃ まで徐々に冷却し、さらに 20 分間 5℃ に保った後、測定を開始した。温度は 90℃ まで毎分 0.2℃ ずつ上昇させ、0.1℃ 間隔で 260 nm における紫外吸収を測定した。なお温度上昇により濃度が変化するのを防ぐため、セルは蓋付きのものをを用い、サンプル溶液表面に鉱油を 1 滴添加し測定を行った。
- 10

測定に用いたアンチセンス鎖及びセンス鎖の配列を次に示す。◎

- 15 なお、本明細書では便宜上天然ヌクレオシドを T, C, A, G のように大文字で表記し、本発明における類縁体をそれぞれ t, c, a, g のように小文字で表記する。

オリゴマーの融解温度

| アンチセンス鎖 / センス鎖               |  | Complementary DNA<br>5'-AGCAAAACGCG-3' | Complementary RNA<br>5'-AGCAAAACGCG-3' |
|------------------------------|--|--|--|
| 5'-GCCGTTTGTGCT-3' (T6)      |  | 47                                     | 45                                     |
| 5'-GCCGXTTGTGCT-3' (XT5)     |  | 45                                     |  |
| 5'-GCCGTTXTGTGCT-3' (T2XT3)  |  | 44                                     | 47                                     |
| 5'-GCCGTTTGTGCT-3' (T3XT2)   |  | 43                                     | 44                                     |
| 5'-GCCGTTTXXGCT-3' (T5X)     |  | 45                                     |  |
| 5'-GCCGXXTTGTGCT-3' (X2T4)   |  | 34                                     |  |
| 5'-GCCGTTXXGTGCT-3' (T2X2T2) |  | 37                                     | 42                                     |
| 5'-GCCGTTTXXGCT-3' (T4X2)    |  | 37                                     | 43                                     |
| 5'-GCCGXXXXXXGCT-3' (X6)     |  | N.D.                                   | 28                                     |

N.D. : 検出されず

天然型及び非天然型の下記のオリゴヌクレオチドについて、オリゴヌクレオチドを3'側から分解するエキソヌクレアーゼに対する耐性を調べた。

15分間37℃に保ったオリゴヌクレオチドのバッファー溶液(10  $\mu$ M, 400  $\mu$ l)に、蛇毒ホスホジエステラーゼのバッファー溶液(0.003 U/ml, 400  $\mu$ l)を混合した。オリゴマーの分解による紫外部吸収(260 nm)の増加をSHIMADZU UV-2100PCを用い、37℃で経時的に測定した。用いたバッファーの組成はTris HCl (pH 8.6) 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 1.4 mMであり、測定前に十分に脱気した。

天然鎖 5' - G T T T T T T T T T T T C - 3'

X2      5' -GTTTTTTTTTXXC-3'

15 測定開始時 ( $t = 0$ ) 及び紫外外部吸収 ( $260 \text{ nm}$ ) の増加が認められなくなった時点での紫外外部吸収値の平均値を示す時間を半減期 ( $t_{1/2}$ ) とした。結果は次の通りである。

| オリゴヌクレオチド | t <sub>1/2</sub> (秒) |
|-----------|----------------------|
| 天然鎖       | 350                  |
| X2        | 1390                 |

また、紫外外部吸収の経時変化を示すチャートを図 1（天然鎖）及び図 2（X 2）  
20 に示した。天然鎖は酵素反応開始後、約 30 分で紫外外部吸収値が一定となり、X  
2 では約 90 分で一定となった。

## 配列表

出願人の氏名：今西武

発明の名称：新規ヌクレオチド類縁体

整理番号：

出願番号：

出願日：平成9年11月18日

優先権番号：特願平8-306585号

優先日：平成8年11月18日

配列の数：10

配列番号：1

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5' - GCGXTTTTTGCT - 3'

配列番号：2

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5' - GCGTTXTTTGCT - 3'

配列番号：3

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5' - G C G T T T X T T G C T - 3'

配列番号：4

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5' - G C G T T T T T X G C T - 3'

配列番号：5

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5' - G C G X X T T T T G C T - 3'

配列番号：6

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：



5' - GCGTTXXTTGCT - 3'

配列番号 : 7

配列の長さ : 12

配列の型 : ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

5' - GCGTTTTTXXGCT - 3'

配列番号 : 8

配列の長さ : 12

配列の型 : ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

5' - GCGXXXXXXXXGCT - 3'

配列番号 : 9

配列の長さ : 13

配列の型 : ヌクレオチド

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

5' - GTTTTTTTTTTTTC - 3'

配列番号 : 10

配列の長さ : 13

WO 98/22489

PCT/JP97/04187

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

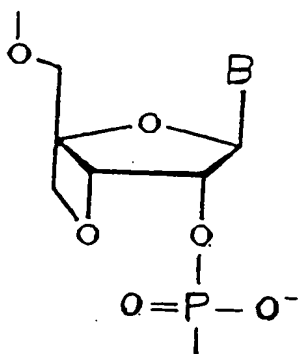
トポロジー：直鎖状

配列：

5' -GTTTTTTTTTXXC-3'

## 請求の範囲

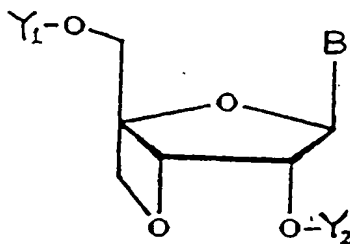
## 1. 一般式：



〔式中、Bは同一または異なってもよく、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基またはそれらの誘導体である〕で表されるモノマー単位を1または2以上含有するオリゴまたはポリヌクレオチド類縁体。

2. 上記オリゴヌレオチドもしくはポリヌクレオチドが合計2～50個のヌクレオチド単位からなることを特徴とする請求項1記載のオリゴまたはポリヌクレオチド類縁体。

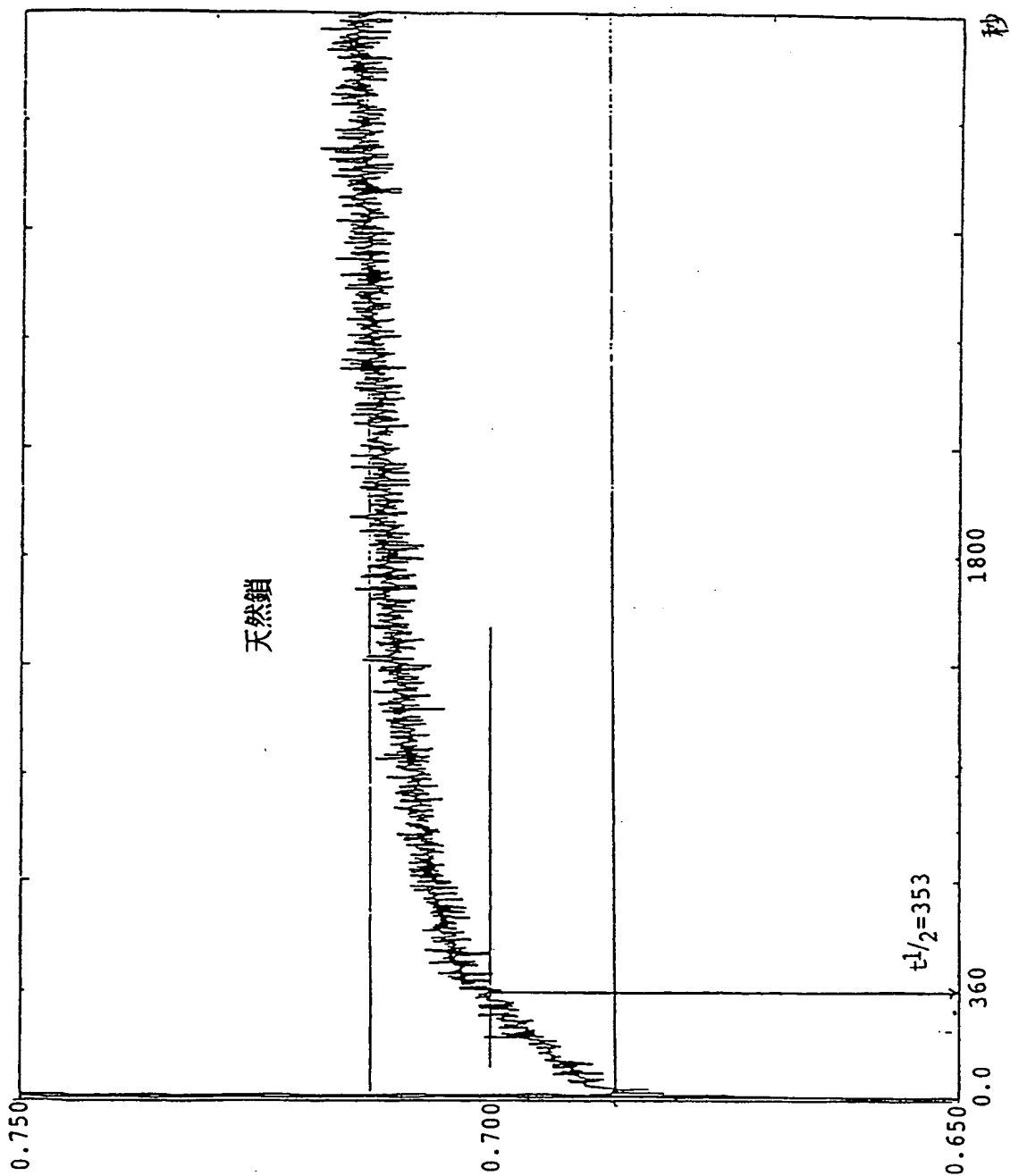
## 3. 一般式：



〔式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、Y₁及びY₂は同一もしくは異なり、水素または水酸基の保護基である〕で表わされるヌクレオシド類縁体。

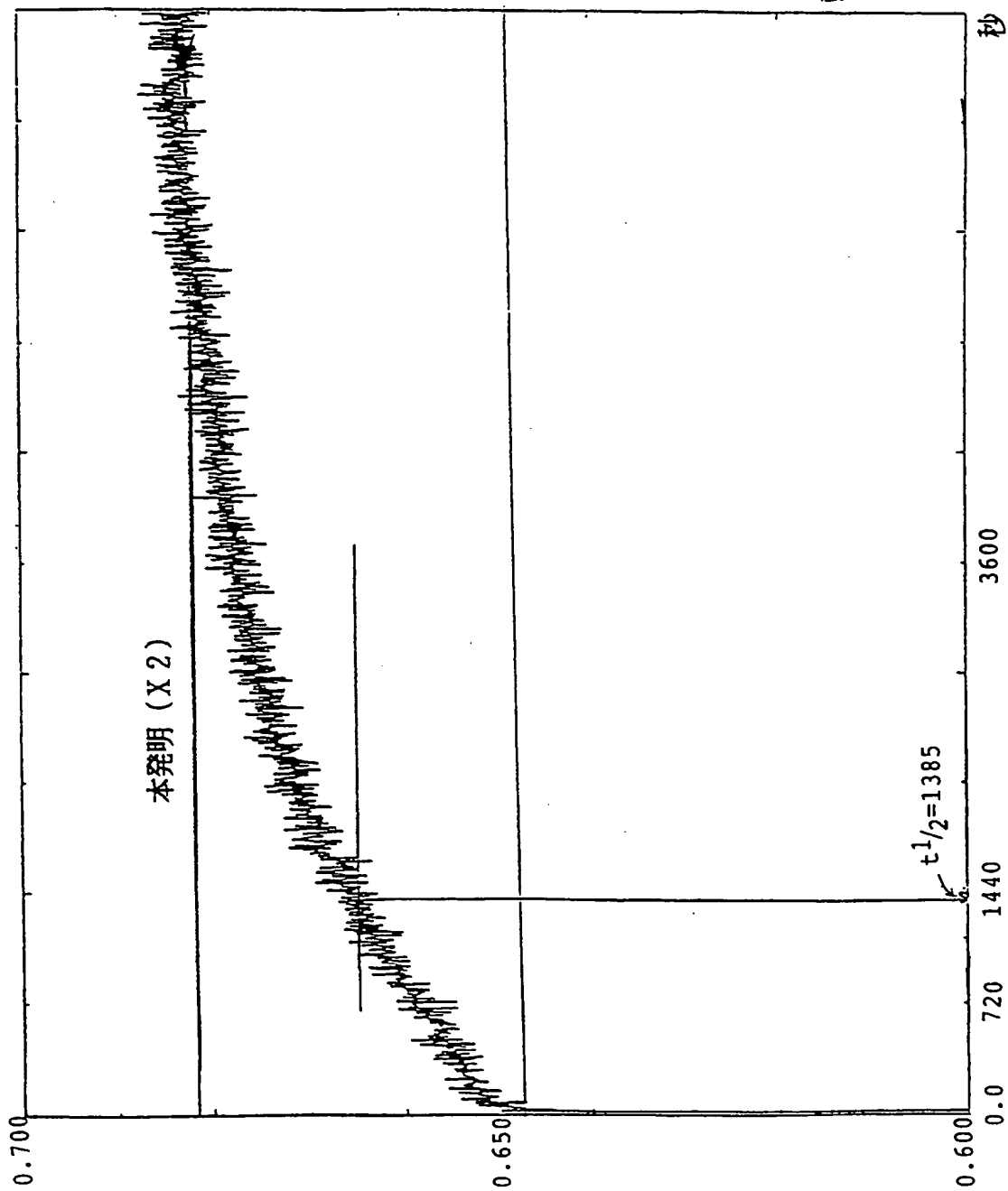
1 / 2

図 1



2 / 2

図 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04187

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C07H21/00, C07H19/06, C07H19/16, A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C07H21/00, C07H19/06, C07H19/16, A61K31/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages    | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | JP, 6-80688, A (Asahi Breweries, Ltd.),<br>March 22, 1994 (22. 03. 94),<br>Pages 1, 2 | 1 - 3                 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
February 23, 1998 (23. 02. 98)

Date of mailing of the international search report  
March 3, 1998 (03. 03. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/04187

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int cl<sup>°</sup> C07H21/00, C07H19/06, C07H19/16, A61K31/70

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int cl<sup>°</sup> C07H21/00, C07H19/06, C07H19/16, A61K31/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                               | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A               | JP, 6-80688, A (アサヒビール株式会社) 22. 3<br>月. 1994 (22. 03. 94) 第1-2頁 | 1-3              |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 02. 98

国際調査報告の発送日

03.03.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4C

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

\*\*\*\*\*  
\*\*\* AKTIVITETSRAPPORT \*\*\*  
\*\*\*\*\*

TRANSMISSION OK

TR/MODT.#

7446

ANDEN PARTS TEL

045661888

DEN ANDEN PARTS ID

STARTTID

03/06 15:34

TIDSFORBRUG

09'21

SIDER

27

RESULTAT

OK